

Original Breve

Concepción Fernández-Roldán¹
Javier Rodríguez-Grangér²
Rosario Javier Martínez¹
Miguel Ángel López-Ruz¹
José María Navarro-Mari²
José Gutiérrez-Fernández^{2,3}

Comportamiento de la prueba KAtex en el cribado y diagnóstico de la leishmaniasis visceral en un hospital de referencia

¹Unidad de Enfermedades Infecciosas. Hospital Virgen de las Nieves. Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada.

²Servicio de Microbiología. Hospital Virgen de las Nieves. Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada.

³Departamento de Microbiología. Universidad de Granada. Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada.

RESUMEN

Introducción. La utilización de pruebas diagnósticas simples empleando muestras no invasivas en el diagnóstico de la leishmaniasis visceral (LV) en nuestro entorno puede resultar muy útil, siendo necesario compararlas con los métodos tradicionales. El objetivo de este trabajo fue conocer la utilidad diagnóstica de la prueba KAtex en la orina de pacientes con sospecha de LV en nuestro medio.

Material y métodos. De forma retrospectiva se revisaron las historias clínicas de los pacientes con sospecha de LV a los que se les realizó la prueba KAtex entre 2009 y 2015. Para la evaluación de su capacidad diagnóstica se seleccionaron los pacientes a los que se les había investigado la presencia del parásito en médula ósea.

Resultados. De los 110 pacientes estudiados, en 44 (40%) se realizó biopsia de médula ósea para la investigación de *Leishmania*. En estos pacientes la sensibilidad de la prueba KAtex fue del 50%, la especificidad del 96,7%, el valor predictivo positivo del 87,5% y el valor predictivo negativo del 80,5%.

Conclusiones. La sensibilidad de la antigenuria KAtex es demasiado baja para recomendarla como único método en la detección de LV en nuestro medio.

Palabras clave: antigenuria, leishmaniasis, KAtex

Performance of the KAtex test in screening and diagnosis for visceral leishmaniasis in a reference hospital

ABSTRACT

Introduction. Performing of diagnostic test simple using samples not invasive in the diagnosis of visceral leishmaniasis (VL) may be very beneficial, being necessary comparing to traditional methods. The objective of this study was to know the reliability of test KAtex in the urine of patients with suspicion of VL.

Material and methods. Retrospectively were reviewed the medical histories of patients with suspected of VL to which are performed the test between 2009 and 2015. For its analysis were selected the patients to which is them had made study of the parasite in bone marrow.

Results. A total of 110 patients were studied, and bone marrow biopsy for research of *Leishmania* was performed in 44 (40%). In these patients the sensitivity of the test was 50%, the specificity of 96.7%, positive predictive value of 87.5% and negative predictive value of 80.5%.

Conclusions. KAtex antigenuria sensitivity is too low recommending it as a unique method in the detection of VL in our medium.

Key words: antigenuria, leishmaniasis, KAtex

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis visceral (LV) es una enfermedad endémica en el conjunto de países del área mediterránea causada por parásitos pertenecientes al género *Leishmania*¹. Los datos para sospechar una posible LV incluyen fiebre prolongada, esplenomegalia, pancitopenia, elevación de enzimas hepáticas, hipergammaglobulinemia, hepatopatía y pérdida de peso². Aunque la demostración de la presencia del parásito en los aspirados de

Correspondencia:
José Gutiérrez-Fernández.
Laboratorio de Microbiología. Hospital Virgen de las Nieves.
Avenida de las Fuerzas Armadas, 2.
E-18012 Granada, España.
E-mail: josegf@go.ugr.es

medula ósea sigue siendo el *gold standard* en el diagnóstico de la LV, es una técnica invasiva y dolorosa para el paciente, con una sensibilidad entre 60%-85% en la visualización directa³. Por otro lado, existe la posibilidad de realizar un diagnóstico indirecto, mediante la utilización de técnicas serológicas que varían en su formato de presentación (ELISA, IFI, inmunocromatografía, aglutinaciones, WB) así como en el antígeno utilizado, habiéndose reconocido el valor del uso del antígeno rk39, con sensibilidad y especificidad entre 80-100% y 77-100%, respectivamente³. Estos métodos serológicos tienen como principales limitaciones que no diferencian entre infección pasada o activa, así como no ser útiles para predecir la respuesta al tratamiento. Otra alternativa para el diagnóstico de LV es el empleo de técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, en muestras de médula ósea, biopsias de tejido o sangre para su realización; estas técnicas han mostrado una sensibilidad y especificidad aceptables pero no están disponibles hoy día en todos los laboratorios⁴. Actualmente se aconseja la utilización de varias técnicas diagnósticas para conseguir optimizar el diagnóstico microbiológico de leishmaniasis².

Desde hace años se ha comercializado una nueva herramienta para realizar el diagnóstico de LV mediante un test de aglutinación de látex en orina (KAtex) de pacientes con sospecha de LV, comercializada por Kalon Biological Ltd, UK, informándose como un método alternativo y de fácil realización para el diagnóstico de la LV. Su utilización en zonas endémicas de LV por *Leishmania donovani*, como Sudan, India y Nepal ha sido ampliamente comunicado⁵, sin embargo en zonas hipoendémicas de *Leishmania infantum*, como nuestra área, no existen demasiados trabajos que evalúen esta técnica de aglutinación en orina, salvo en dos estudios realizados en nuestro país^{6,7} con 49 y 12 pacientes coinfectados por VIH/LV, mostrando una sensibilidad entre 85,7% y 100%, y una especificidad de 98,7%, en el último estudio. El objetivo de nuestro trabajo fue realizar un análisis retrospectivo para conocer la rentabilidad diagnóstica de esta técnica KAtex en nuestro medio aplicada al diagnóstico de LV.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se ha realizado en pacientes asistidos en el Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada. Este es un hospital de tercer nivel, que asiste a una población cercana a los 440.000 habitantes. De forma retrospectiva se revisaron las historias clínicas de los pacientes con sospecha de LV a los que se les investigó la antigenuria de *Leishmania* entre 2009 y 2015. Se registraron las siguientes variables: edad, sexo, presencia de inmunodepresión de base, estatus de infección por el VIH, servicio peticionario, presencia de alteraciones hematológicas, visceromegalias, presencia de fiebre sin foco y diagnóstico al alta del paciente.

Para el análisis definitivo de la antigenuria se seleccionaron los pacientes a los que se les había realizado estudio del parásito en médula ósea. El diagnóstico de LV en estos pacientes se estableció mediante la positividad de al menos una de las siguientes pruebas: visualización de formas compatibles

con el parásito mediante tinción de Giemsa o en estudio anatómo-patológico, PCR y/o cultivo.

La antigenuria se realizó mediante el equipo KAtex (Kalon Biological Ltd, UK) siguiendo las instrucciones del fabricante y el resto de técnicas empleadas para el diagnóstico LV se realizó conforme a los procedimientos clásicos empleados en los laboratorios². Las determinaciones de PCR de *Leishmania* se realizaron en el Centro Nacional de Microbiología (Majadahonda, Madrid).

Análisis estadístico. Los datos se analizaron con el paquete de programa estadístico SPSS por MS Windows versión 19.0 (Chicago, IL, EE. UU.). Las variables cuantitativas se describen como la frecuencia de distribución de cada una de las categorías. Se calcularon la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo para los estudios con la prueba KAtex, con un intervalo de confianza del 95%.

Consideraciones éticas. El protocolo del estudio se llevó a cabo con arreglo a la Declaración de Helsinki y la «Comisión de Ética e Investigación Sanitaria de los Centros Hospitalarios y Distritos de Atención Sanitaria». Este fue un estudio no intervencionista, con ninguna investigación adicional a los procedimientos rutinarios. El material biológico se utilizó solo para el diagnóstico estándar de la LV, siguiendo las prescripciones de los médicos. No se realizó muestreo adicional ni modificación del protocolo de rutina. Se hicieron los análisis de datos utilizando una base de datos anónima. Por lo tanto, la aprobación fue considerada innecesaria según las pautas de nuestro país. La entidad que concedió el permiso para acceder y utilizar los datos fue la «Unidad de Gestión Clínica de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica del Complejo Hospitalario Universitario».

RESULTADOS

En los siete años del estudio se realizaron 142 determinaciones de antigenuria procedentes de 115 pacientes. En los pacientes en los que se repitió el estudio se debió mayoritariamente a la sospecha de recurrencia clínica en sujetos inmunodeprimidos (en un nuevo episodio clínico de enfermedad), salvo en 8 pacientes (11 muestras) en los que la prueba se realizó tras el tratamiento, para ver la evolución de este marcador. Se excluyeron del análisis las 11 muestras para control del tratamiento y 9 muestras de 5 pacientes en los que se carecía de información clínica. Así, finalmente se estudiaron 122 muestras de orina de 110 pacientes. Las peticiones se realizaron mayoritariamente por las Áreas de Medicina Interna y Enfermedades Infecciosas (n = 77, 63%), seguida de Hematología (n = 13, 11%).

Cuadros clínicos de los pacientes estudiados y resultados de la prueba KAtex. En los 110 pacientes estudiados mediante antigenuria, los diagnósticos al alta fueron: 1 caso de leishmaniasis cutánea, 5 episodios clínicos de leishmaniasis mucosa y 20 episodios de LV. De éstos 20, 7 se diagnosticaron mediante visualización o PCR en muestras de biopsia (5 de ellos con antigenuria positiva), 8 sólo por antigenuria positiva

Tabla 1 Resultados de la prueba KAtex en los pacientes con biopsia de médula ósea.

	Biopsia Positiva	Biopsia Negativa	Total
Antigenuria Positiva	7	1	8
Antigenuria Negativa	7	29	36
Total	14	30	44

Tabla 2 Manifestaciones clínicas de los pacientes diagnosticados de leishmaniasis visceral en los que se realizó el estudio en biopsia de médula ósea

	Características de los 14 episodios de leishmaniasis visceral
Antigenuria diagnóstica (+)	7
Antigenuria diagnóstica (-)	7
Edad (Media/Mediana)	41,8/47,5
Mujeres / Hombres	2/12
Presencia de inmunodepresión de base	9 (34,6%)
Portador del VIH	5 (41,7%)
Alteración hematológica	12 (85,7%)
Biopsia de médula ósea	14 (100%)
Esplenomegalia (+)	7(38,9%)
Fiebre sin foco (+)	9 (47,3%)
Hepatomegalia	3 (33,3%)

y 5 por respuesta al tratamiento específico, a pesar de que las pruebas parasitológicas disponibles entonces en nuestro centro fueron negativas. Destacar que de estos 5 pacientes en sólo uno se realizó PCR que fue negativa.

De las 122 muestras analizadas, la detección de antígeno de *Leishmania* fue positiva en 14 (11,5%) y negativa en las 108 restantes (88,5%). No hubo resultados indeterminados. Las 14 antigenurias positivas procedían de 13 pacientes de los cuales 12 fueron diagnosticados de LV (todos varones, de una edad media de 46 años, con una mediana y moda 48 años). El paciente que presentando una reacción positiva no fue diagnosticado de LV, fue un sujeto VIH (+) que no mejoró al instaurar tratamiento con anfotericina B y finalmente falleció diagnosticado de un síndrome mielodisplásico.

Rentabilidad diagnóstica de la prueba KAtex en pacientes con biopsia de médula ósea. De los 110 pacientes estudiados, se realizó biopsia de médula ósea para investigación de *Leishmania* en 44 (40%) pacientes, que se seleccionaron para nuestra evaluación de la prueba KAtex. Con respecto a la clínica de los paciente que motivó la realización de las pruebas, el 95% presentaron alteraciones hematológicas, fiebre el 45%, esplenomegalia el 43% y hepatomegalia el 21%. De todos ellos, 14 (31,8%) fueron diagnosticados al alta de LV, de

los que sólo 7 (50%) tuvieron antigenuria positiva. El 34,6% de los diagnosticados de LV presentaban algún tipo de alteración del sistema inmune, estando el 41,6% de ellos infectado por el VIH. En la tabla 1 se reflejan los resultados de la prueba KAtex en los pacientes con biopsia de médula ósea con diagnóstico objetivo mediante la visualización o PCR. En estos pacientes con estudio en biopsia de médula ósea la sensibilidad de la prueba KAtex fue del 50% (IC: 24,04 - 75,96), la especificidad del 96,7% (IC: 80,95 - 99,83), el valor predictivo positivo del 87,5% (IC: 46,68 - 99,34) y el valor predictivo negativo del 80,5% (IC: 63,43-91,20). La prevalencia de la enfermedad en nuestra muestra cuando se realiza la biopsia dirigida en la población con datos compatibles con LV fue del 31,82% (IC: 19,07- 47,71). Las manifestaciones clínicas de los 14 casos de LV se resumen en la tabla 2. Un paciente era trasplantado.

DISCUSIÓN

La antigenuria de *Leishmania* está basada en la detección de antígenos de este parásito en la orina. Recientemente este ha sido caracterizado y reconocido como un glucoconjugado de bajo peso molecular (5-20 KD)⁸. La prueba KAtex presentó en nuestro medio una sensibilidad inferior a los datos publicados en la bibliografía^{6,7,9}, que se aproximan a valores del 100% de sensibilidad. Sin embargo, nuestra sensibilidad se acerca a valores obtenidos en otros estudios más recientes¹⁰, que refieren menor sensibilidad

Aunque la detección de antígenos de *Leishmania* en orina tiene una buena especificidad y buenos valores predictivos positivo y negativo, la sensibilidad de la prueba es baja en nuestro medio, al igual que ocurre en zonas de mayor prevalencia, aspecto que ya puso de manifiesto la revisión sistemática publicada por Cochrane¹⁰ para algunas evaluaciones. En esta revisión la prueba KAtex, cuando se utilizó en un entorno clínico en pacientes con esplenomegalia febril, tuvo una sensibilidad general del 63,6% (IC 95%: 40,9-85,6) y especificidad del 92,9% (IC 95%: 76,7-99,2). Esto hace que sea una prueba sub-óptima para el despistaje de la enfermedad, precisando realizar otras pruebas adicionales para el diagnóstico si la sospecha es alta, como es recomendado en la actual guía IDSA². Creemos que en un ambiente epidemiológico de baja prevalencia, como el nuestro, en un país desarrollado y con disponibilidad de más y mejores medios diagnósticos (como la biología molecular), el estudio de los pacientes con sospecha de LV no debe limitarse al uso de la detección de antígenos en orina, sino que debe completarse con otras pruebas, para evitar el riesgo de infradiagnosticar una enfermedad potencialmente mortal. Por lo tanto, la sensibilidad de la aglutinación de látex KAtex en la orina es demasiado baja para recomendarla en las guías de práctica estándar para la detección de LV en un entorno similar al nuestro. No podemos dejar de resaltar el hecho

de que un resultado negativo en la detección de antigenuria podría disuadir erróneamente al clínico de realizar pruebas más cruentas e invasivas (nuestros clínicos realizaron biopsia de médula ósea en menos de la mitad de los pacientes a los que solicitaron la antigenuria). Esto podría implicar un número inaceptable de falsos negativos, como se deriva de su baja sensibilidad. Por otro lado, sólo en algo más de la mitad de los pacientes diagnosticados y con antigenuria positiva se solicitó antigenuria para el control de la respuesta al tratamiento. La realización de ésta segunda prueba (en orina) podría aportar información sobre la respuesta al tratamiento (la negativización) o un mayor riesgo de recidivas (si persiste positiva). Este uso de la antigenuria tendría interés dado que la serología no es útil para seguir la respuesta al tratamiento (menos aun en inmunodeprimidos), ya que no está recomendado repetir las pruebas (invasivas) para confirmar la respuesta al tratamiento². Quizá sea interesante señalar que en nuestra muestra un elevado número de pacientes presentaban alteraciones de la inmunidad, lo que puede alterar las manifestaciones clínicas de la LV y dificultar el diagnóstico. Así, la utilización de distintas pruebas diagnósticas en un paciente, pueden aumentar la posibilidad de un diagnóstico positivo, especialmente si no se dispone de técnicas de biología molecular. Además, la realización de varias antigenurias sucesivas podría aumentar el número de diagnósticos. En conclusión, la sensibilidad de la prueba de antigenuria KAtex es demasiado baja para recomendarla como único método diagnóstico en nuestro medio para diagnóstico de LV por el laboratorio de Microbiología.

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor D. Juan de Dios Luna del Castillo, de la Universidad de Granada, y a D^a Manuela Expósito Ruiz del Instituto de Investigación Sanitaria de Granada por el análisis estadístico de los resultados obtenidos.

FINANCIACIÓN

Los autores declaran no haber recibido financiación para la realización de este estudio.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

1. Monge-Maillo B, Norman FF, Cruz I, Alvar J, López-Vélez R. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in the Mediterranean region. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8:e302.
2. Aronson N, Herwalt BL, Libman M, Pearson R, Lopez Velez R, Weina P, et al. Diagnosis and treatment of leishmaniasis: Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america (IDSA) and the american society of tropical medicine and hygiene. *Clin Infect Dis*. 2016;63:e202-e64.
3. Elmahallawy EK, Sampedro Martinez A, Rodriguez-Granger J, Hoyos-Mallecot Y, Agil A, Navarro Mari JM, et al. Diagnosis of leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries*. 2014; 8:961-72.
4. Reithinger R, Dujardin JC. Molecular diagnosis of leishmaniasis: Current status and future applications. *J Clin Microbiol*. 2007; 45: 21-5.
5. Boelaert M, El Safi S, Hailu A., Mukhtar M, Rijal S, Sundar S, et al. Diagnostic test for Kala-Azar: a multicentre study of the freeze dried DAT, rk39 strip test and Katex in east Africa and the Indian subcontinent. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008; 102: 32-40.
6. Vilaplana C, Blanco S, Domínguez J, Giménez M, Ausina V. Noninvasive method for diagnosis of visceral leishmaniasis by a latex agglutination test for detection of antigens in urine samples. *J Clin Microbiol*. 2004; 42:1853-4.
7. Riera C, Fisa P, Lopez P, Ribera J, Carrio V, Falco I, et al. Evaluation of latex agglutination test (KAtex) for detection of leishmaniasis antigen in urine of patients with HIV-*Leishmania* coinfection: value in diagnosis and post-treatment follow-up. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23:899-904.
8. Sarkari B, Chance M, Hommel M. Antigenuria in visceral leishmaniasis: detection and partial characterization of a carbohydrate antigen. *Acta Trop*. 2002; 82:339-48.
9. Cruz I, Chicharro C, Nieto J, Bailo B, Canavete C, Figueres M, et al. Comparison of new diagnostic tools for management of pediatric mediterranean visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol*. 2006; 44:2343-7.
10. Boelaert M, Verdonck K, Menten J, Sunyoto T, van Griensven J, Chappuis F, et al. Rapid tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis in patients with suspected disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;(6):CD009135.